

## ヌードマウス移植ヒト神経芽腫および横紋筋肉腫に 対するイリノテカン(CPT-11)の抗腫瘍作用

金子 節子<sup>1)</sup>, 金子 道夫

### 要 旨

10種類の抗腫瘍剤を用いたヌードマウス移植ヒト神経芽腫および横紋筋肉腫の感受性試験で通常用量CPT-11はCPAと並ぶ優れた増殖抑制作用を有した。さらに、通常用量CPT-11・間欠投与法に比べ、低用量CPT-11・連日投与法の抗腫瘍効果は6系統の移植腫瘍のうち5系統で有意に高かった。低用量CPT-11投与では休業期間を長くしない方がより有効であった。CPT-11の投与用量に関わらずマウスにスコア1の急性下痢を認めたと遅発性の下痢は見られなかった。低用量CPT-11・連日投与による白血球数減少も深刻な体重減少もなかった。

Key Words: 神経芽腫, 横紋筋肉腫, ニードマウス移植ヒト腫瘍, CPT-11, 抗腫瘍作用

### I はじめに

イリノテカン(CPT-11)はトポイソメラーゼI阻害という新しい作用機序をもつカンプトテシンの易水溶性誘導体として我が国で開発された抗腫瘍剤で<sup>1-3)</sup>, 小児悪性腫瘍の治療薬としては未だ認可されていないが, 再発例を中心に既に広く臨床で使用されている。時に難治性下痢, 骨髄障害を主体とする重篤な副作用をきたす<sup>4,5)</sup>。今回我々はヌードマウス移植ヒト神経芽腫および横紋筋肉腫に対するCPT-11の抗腫瘍作用を他の抗腫瘍剤と比較し, マウスへの副作用についても検討したので報告する。

### II 材料および方法

#### 1) ニードマウス移植ヒト神経芽腫およびヒト横紋筋肉腫

用いたヌードマウス移植腫瘍とその性状を表1

表1 ニードマウス移植ヒト神経芽腫およびヒト横紋筋肉腫の性状

ヌードマウス 移植神経芽腫	患児の				
	年齢	性別	原発	Stage	MYCN
SK-N-ASnu	8y	F	no date	4	×1
TNB9	1y	M	副腎	IV	×80
TS-N-2nu	4y	F	副腎	IV	×13
TS-N-5nu	1y	M	後腹膜	4	×100<

ヌードマウス 移植横紋筋肉腫	患児の				
	年齢	性別	原発	Stage	組織型
TS-RM-1nu	5y	F	頸部	II	胞巢型
TS-RM-2nu	8mo	M	肩胛骨部	II	多形型
TS-RM-3nu	3y	M	後腹膜	III	胎児型
TS-RM-5nu	14y	M	傍精巣	1	胎児型
TS-RM-6nu	14y	F	側頭部	2	胎児型

に示した。神経芽腫株細胞SK-N-AS由来のSK-N-ASnuおよび東京大学の土田等により樹立されたTNB9以外は全て本研究室で樹立された。

#### 2) 抗腫瘍剤感受性試験

用いた抗腫瘍剤は, 小児腫瘍に対する従来

1) 筑波大学大学院総合人間科学研究科小児外科

療薬である cyclophosphamide (CPA), ifosfamide (IFM), cisplatin (CDDP), carboplatin (CBDCA), melphalan (L-PAM), vincristine (VCR), etoposide (VP-16), pirarubicin (THP) に CPT-11 を加えた 9 薬剤, 横紋筋肉腫移植系に対しては, さらに actinomycin D (ACD) を加えた 10 薬剤であった. 実験方法は, ほぼ Battelle Columbus Laboratories のプロトコル<sup>6,7)</sup> に従い, 雄の 5 週齢 BALB/c-nu/nu マウス (CLEA Japan) の片側皮下に 1 辺 4 mm 大の腫瘍を移植し, 以下の換算式で求めた腫瘍重量が 150~200 mg に達した時点でマウスを 6 匹ずつ治療群と対照群に分け, 抗腫瘍剤または生理食塩液の投与を開始した (day 0). 以後, 4 日ごとにマウス体重と腫瘍の大きさを計測し, 次式により腫瘍重量を計算した.

腫瘍重量 (mg) = 短径 (mm)<sup>2</sup> × 長径 (mm) × 1/2

抗腫瘍剤はマウス半数致死量 (LD<sub>50</sub>) の 1/3 を 4 日ごとに 3 回, THP は静脈内, その他は腹腔内投与した. 幹細胞移植の前処置に用いられる L-PAM だけは LD<sub>50</sub> 量を day 0 に単回投与した. 抗腫瘍効果は次式で得られる腫瘍増殖抑制率 (I.R.) の最大値により評価した.

$$I.R. = [1 - RTW_t(x) / RTW_c(x)] \times 100 (\%)$$

RTW<sub>t</sub>(x) および RTW<sub>c</sub>(x) : day x での治療群および対照群のそれぞれ day 0 に対する平均腫瘍重量比.

そして, 治療終了後に腫瘍が day 0 より縮小した場合を著効 (++) , 治療群の腫瘍の短径・長径がともに最大で対照群の 3/4 以下となった場合 (max.I.R. ≥ 58%) を有効, max.I.R. < 58% を無効と判定した.

### 3) CPT-11 の低用量・連日投与

CPT-11 については抗がん剤感受性試験の通常投与方法である 1 回 LD<sub>50</sub> × 1/3 量 (59 mg/kg/dose, 通常用量) の 4 日ごと 3 回投与の他に LD<sub>50</sub> × 1/30 量 (5.9 mg/kg/dose, 低用量) を ① 14 日間または 20 日間連日投与 (qd × 14 または qd × 20), あるいは ② 週 5 日連日・2 週間連続のサイクルを 3 週間ごとに 2 回繰り返して投与 ([ (qd × 5)<sup>2</sup> ]<sub>2</sub>) する方法も試みた. 各治療群の平均腫瘍重量倍加時間 (TD<sub>2</sub>) を比較して抗腫瘍効果を評価した. 有意差

検定には Student's t-test あるいは Welch's t-test を用いた.

### 4) CPT-11 による副作用の検討

各治療群について経時的に [マウス体重 - 腫瘍重量] の平均値を求め, 対照群マウスに対する最大体重減少率を算出した. さらに, CPT-11 投与によって引き起こされる下痢の頻度と Kurita et al.<sup>8)</sup> が示したスコア, および治療終了後 1 日, 7 日, 14 日目の白血球数を調べた.

## III 結 果

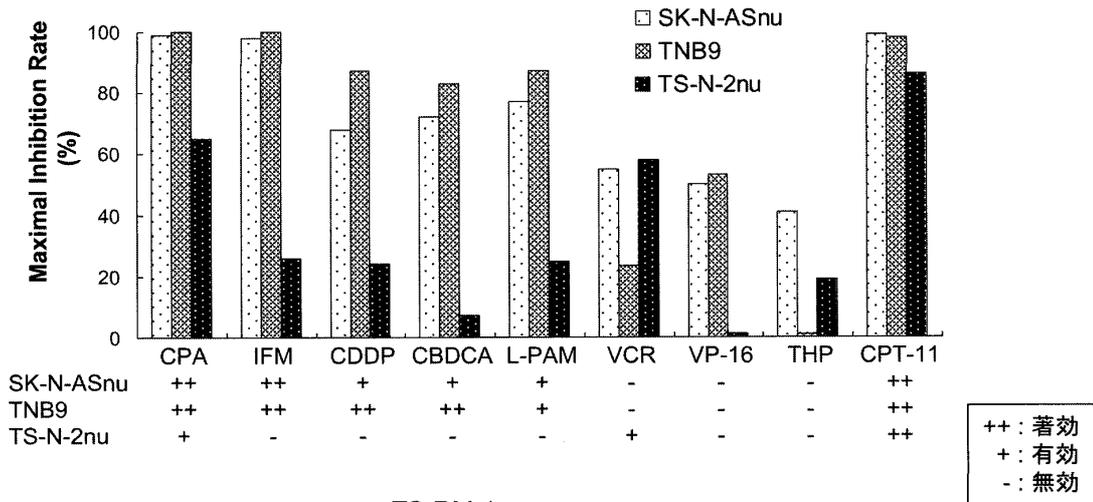
### 1) 抗腫瘍剤の最大腫瘍増殖抑制率と抗腫瘍効果判定

ヌードマウス移植ヒト神経芽腫に対して CPT-11 と CPA は特に優れた腫瘍増殖抑制作用を有し, 3 系統全てに有効あるいは著効であった (図 1A). 一方, VP-16 と THP は全てに無効の判定であった. SK-N-ASnu と TNB9 の抗がん剤感受性は比較的高かったが TS-N-2nu は多剤耐性の移植腫瘍で, 同じ神経芽腫でも薬剤感受性に大きな差がみられた. ヌードマウス移植ヒト横紋筋肉腫のうち TS-RM-1nu と TS-RM-3nu に対しては CPT-11, CPA, IFM, L-PAM, VCR が著効を示したが, 多形型横紋筋肉腫由来の TS-RM-2nu は抗がん剤高度耐性の移植腫瘍で, 調べた 10 薬剤全てが無効と判定された (図 1B). VCR は神経芽腫よりも横紋筋肉腫で有効性が高い傾向があった. 横紋筋肉腫の主要な治療薬である ACD は TS-RM-3nu で有効であった以外は無効, VP-16 と THP はヌードマウス移植横紋筋肉腫でも 3 系統全てに無効であった.

### 2) ヌードマウス移植腫瘍に対する CPT-11 の抗腫瘍作用

4 系統のヌードマウス移植ヒト神経芽腫および 2 系統のヌードマウス移植ヒト横紋筋肉腫に対し低用量 CPT-11 を連日投与すると, 通常用量 CPT-11・間欠投与の場合に比べ TS-N-2nu 以外の 5 系統では通常用量投与のときを上回る腫瘍の縮小効果と, 腫瘍倍加時間 (TD<sub>2</sub>) の有意な延長が得られた (図 2, 表 2). SK-N-ASnu, TS-RM-5nu, TS-RM-6nu では低用量 CPT-11 治療終了後

(A)



(B)

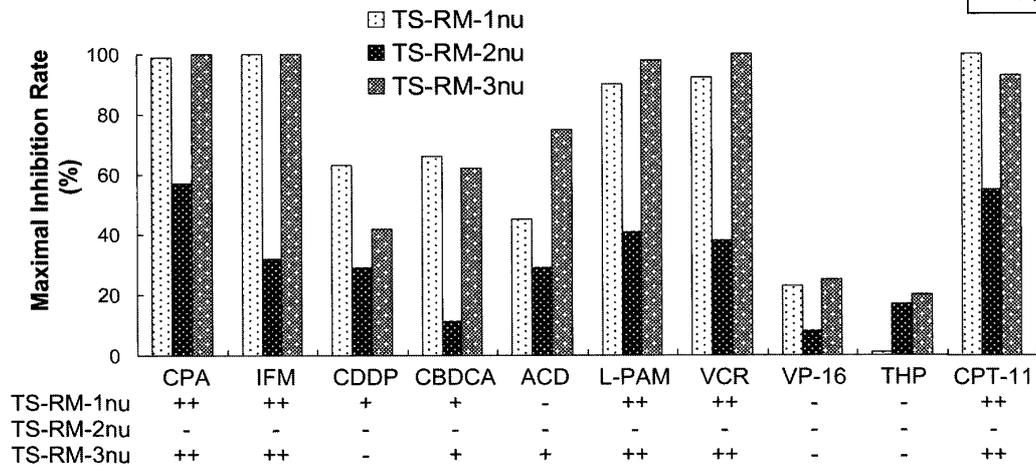


図1 ノードマウス移植 (A) ヒト神経芽腫および (B) ヒト横紋筋肉腫に対する抗腫瘍剤の最大腫瘍増殖抑制率と抗腫瘍効果判定

CPT-11はCPAと並ぶ優れた腫瘍増殖抑制作用を有した。

CPA, cyclophosphamide; IFM, ifosfamide; CDDP, cisplatin; CBDCA, carboplatin; L-PAM, melphalan; VCR, vincristine; VP-16, etoposide; THP, pirarubicin; CPT-11, irinotecan; ACD, actinomycin D.

2~3週間にわたって腫瘍の再増殖を認めなかった。一方TS-N-2nuに対する低用量CPT-11連日投与の場合は、治療中にもかかわらず腫瘍の再増殖が始まった。

次に、低用量CPT-11の抗腫瘍効果を、qd×20の場合とHoughton et al.<sup>9)</sup>の報告に従って間に1週間以上の休薬期間を設けながら1か月以上かけて20回頻回投与する場合([(qd×5)2]2)とで比較した結果、qd×20のTD<sub>2</sub>は検討した4腫瘍のうち1腫瘍で[(qd×5)2]2より有意に延長され(表2)、抗腫瘍効果は[(qd×5)2]2の場合と同等以上であった。[(qd×5)2]2では調べた4系統全てで休薬期間中に腫瘍が再増殖し始め、ヌ

ードマウス移植神経芽腫は3系統とも次の治療サイクルでのCPT-11感受性が明らかに低下した(図3)。

TS-N-2nuの[(qd×5)2]2でのTD<sub>2</sub>は休薬期間内にあり、通常用量・間欠投与の場合よりも有意に短かった(表2)。

### 3) CPT-11による副作用

マウスの体重減少はTS-N-5nuとTS-RM-6nuに対する通常用量CPT-11・間欠投与の場合が最も大きく、低用量CPT-11・頻回投与での最大体重減少率はいずれも10%未満であった(表2)。全ての実験を通じてマウスの死亡はなかった。CPT-11を投与すると、用量に関わら

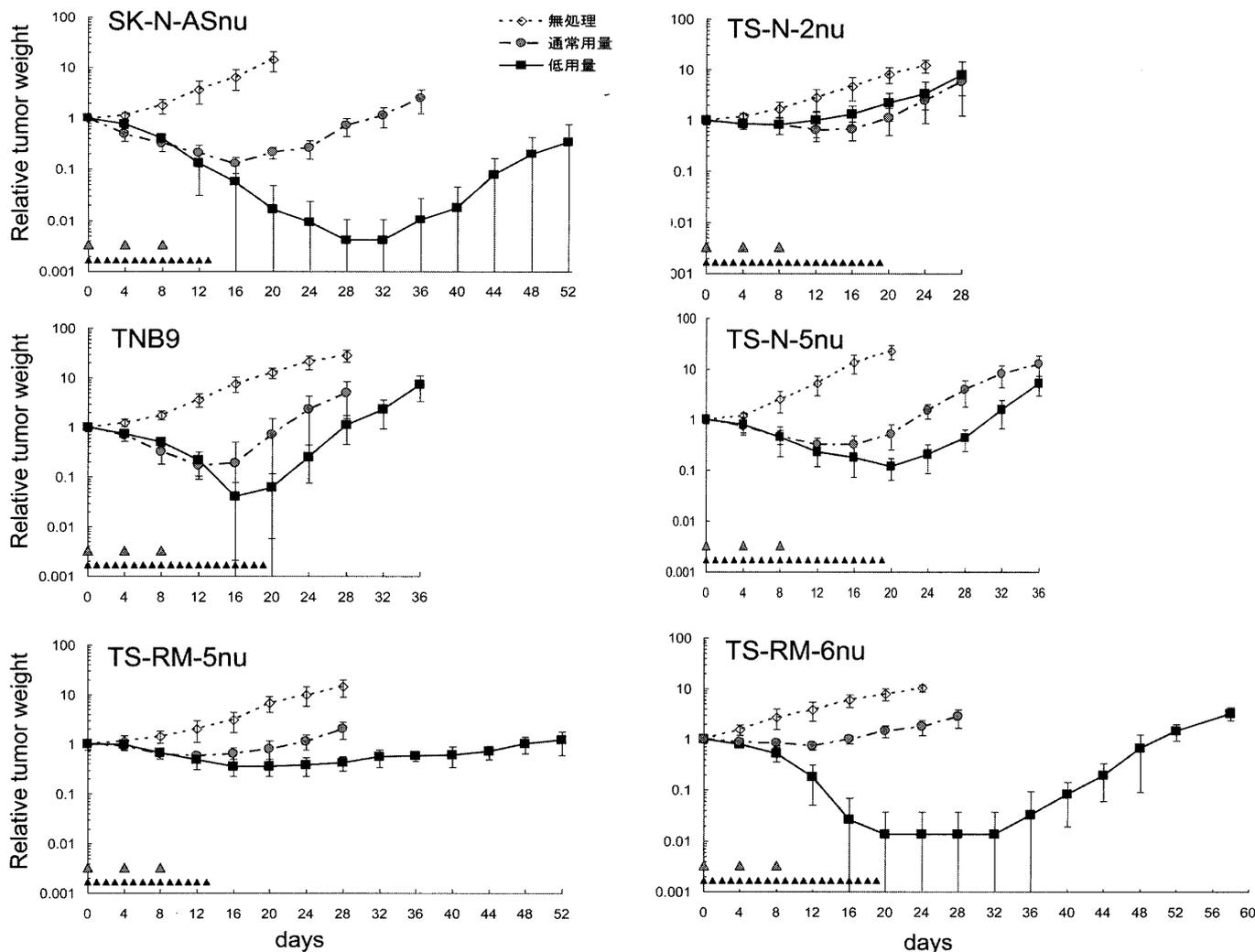


図2 ノードマウス移植ヒト神経芽腫およびヒト横紋筋肉腫に対する通常用量 CPT-11 と低用量 CPT-11 の作用  
 低用量 CPT-11・連日投与による抗腫瘍効果は調べた 6 系統中 5 系統で従来の投与方法よりも明らかに高かった。  
 通常用量：LD<sub>50</sub> × 1/3, 59 mg CPT-11/kg/dose  
 低用量：LD<sub>50</sub> × 1/30, 5.9 mg CPT-11/kg/dose

ずその都度、投与後 90 分以内にマウスのほぼ 80% に Kurita et al.<sup>8)</sup> の定義によるスコア 1 の軽微な下痢(有形軟便)が観察された(表 3)。下痢は 4 時間以内に治まり、治療終了後の遅発性の下痢は全く認めなかった。通常用量 CPT-11・間欠投与による治療終了 24 時間後の白血球数は無治療の場合と比べて有意に減少していた(p<0.01)。

#### IV 考 察

ノードマウス移植ヒト神経芽腫および横紋筋肉腫に対して通常用量・間欠投与での CPT-11 は CPA と並ぶ優れた腫瘍増殖抑制作用を有した。

CPA など主要な抗腫瘍剤の細胞増殖抑制効果の発現は用量依存性であるが、CPT-11 では時間依存性である<sup>10)</sup>。今回、実験に用いた CPT-11 の総投与量は通常用量・間欠投与では半数致死量であったのに対し低用量・連日投与ではその 1/2 未満~2/3 で、後者はより少ない総投与量で前者と同等あるいは有意にそれ以上の抗腫瘍効果を示した。同じトポイソメラーゼ I 阻害作用をもつカンプトテシン類でも同様の結果が得られている<sup>9,11,12)</sup>。Houghton et al.<sup>9)</sup> はノードマウス移植小児横紋筋肉腫 6 系統を含む 21 移植腫瘍系に CPT-11 を 1 治療サイクル(qd×5)2 で投与し、

表2 CPT-11の投与スケジュールとマウスの最大体重減少率および腫瘍倍加時間

ヌードマウス移植腫瘍		CPT-11		最大体重	腫瘍倍加時間 (日)		
		用量, 投与スケジュール	総投与量	減少率(%)			
神経芽腫	SK-N-Asnu	0	0		9.5±2.3		
		通常用量, q4d×3	LD <sub>50</sub>	9	35.5±2.6		
		低用量, qd×14	< LD <sub>50</sub> ×1/2	3	>52.0		
	TNB9	0	0		8.9±1.9		
		通常用量, q4d×3	LD <sub>50</sub>	6	p=0.431	25.3±3.8	p=0.0077
		低用量, qd×20	LD <sub>50</sub> ×2/3	2		31.6±2.7	
	低用量, [(qd×5)2]2	LD <sub>50</sub> ×2/3	6	22.4±7.6			
	TS-N-2nu	0	0		10.2±2.6		
		通常用量, q4d×3	LD <sub>50</sub>	4	p=0.0029	23.0±2.4	p=0.412
		低用量, qd×20	LD <sub>50</sub> ×2/3	8		21.2±4.3	
	低用量, [(qd×5)2]2	LD <sub>50</sub> ×2/3	5	16.6±2.7			
	TS-N-5nu	0	0		7.1±1.1		
通常用量, q4d×3		LD <sub>50</sub>	11	p<0.001	25.8±1.9	p<0.001	
低用量, qd×20		LD <sub>50</sub> ×2/3	9		33.1±1.2		
低用量, [(qd×5)2]2	LD <sub>50</sub> ×2/3	8	36.5±4.6				
横紋筋肉腫	TS-RM-5nu	0	0		11.8±1.5		
		通常用量, q4d×3	LD <sub>50</sub>	2	p<0.001	28.0±2.1	
		低用量, qd×14	< LD <sub>50</sub> ×1/2	3		> 52.0	
	TS-RM-6nu	0	0			7.0±2.4	
		通常用量, q4d×3	LD <sub>50</sub>	11	p<0.001	23.6±2.9	p<0.001
		低用量, qd×20	LD <sub>50</sub> ×2/3	8		53.7±1.7	
低用量, [(qd×5)2]2	LD <sub>50</sub> ×2/3	2	54.5±1.8				

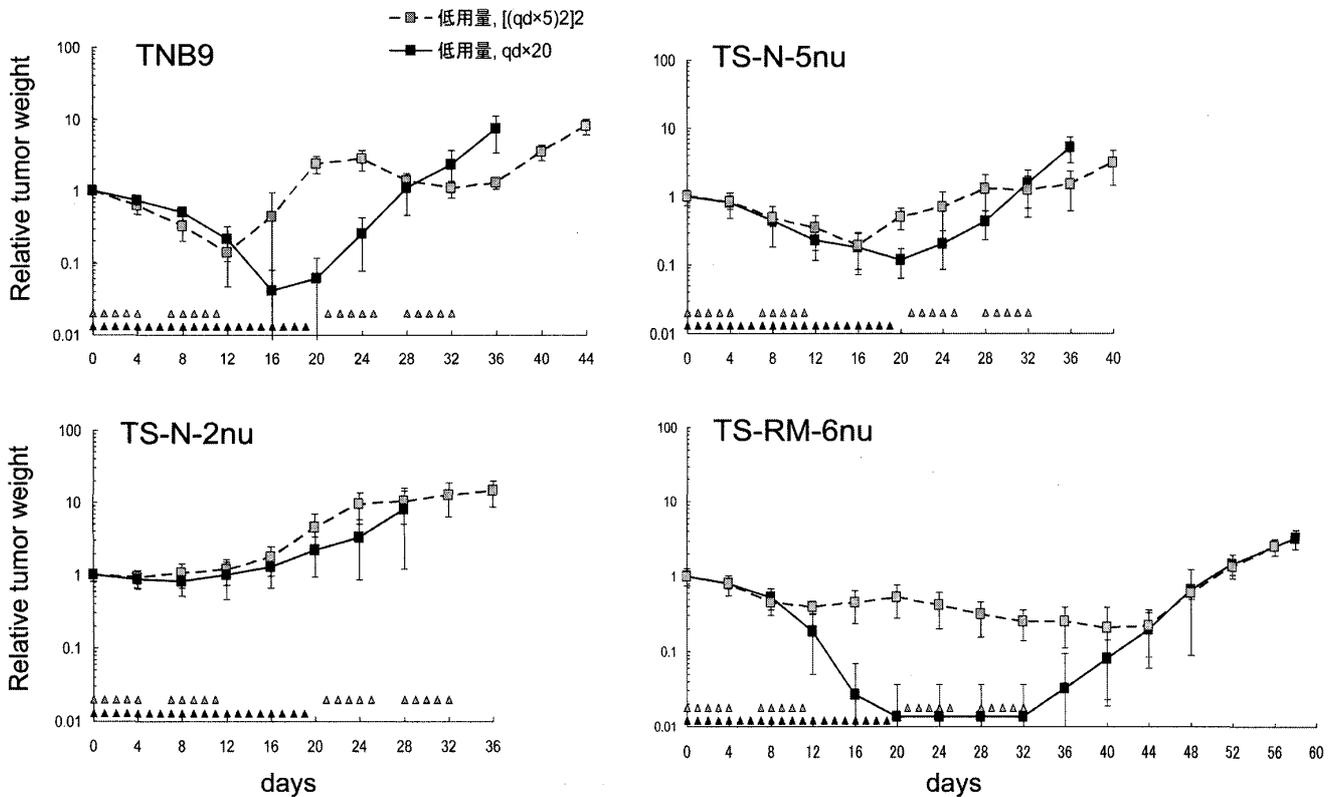


図3 ヌードマウス移植ヒト神経芽腫およびヒト横紋筋肉腫に対する低用量CPT-11の作用  
 qd×20による腫瘍倍加時間は休薬期間を入れた投与方法の場合と同等かそれ以上であった。  
 [(qd×5)2]2: 週5日連続・2週間連続投与, のサイクルを3週間ごとに2回。  
 qd×20: 20日間連日投与

表3 CPT-11 投与による下痢の発生頻度および白血球数の変化

CPT-11 用量, 投与スケジュール	匹数	CPT-11 投与後の 下痢発生頻度 (%)	白血球数 $\times 10^2/\mu\text{l}$		
			治療終了後の日数		
			1	7	14
無処理コントロール	4	0	71 $\pm$ 13		
通常用量, q4d $\times$ 3	3	78 $\pm$ 19	30 $\pm$ 6*	52 $\pm$ 16	84 $\pm$ 16
低用量, qd $\times$ 20	3	82 $\pm$ 12	93 $\pm$ 33	73 $\pm$ 20	73 $\pm$ 16

\*  $p < 0.01$ , 無処理のコントロールとの比較

高い抗腫瘍効果を得た。3週間ごとのサイクルを3回繰り返したときのMTDは10 mg/kg/doseであった。我々は5.9 mg CPT-11/kg/doseで[(qd $\times$ 5) $\times$ 2]2の方法と、それとは異なって休薬期間を設けないqd $\times$ 20での抗腫瘍効果を比較し、後者の連日投与方法の方でより腫瘍の縮小が得られ、TD<sub>2</sub>は同等以上に延長されることを見出した。ただし、特にヌードマウス移植神経芽腫は低用量CPT-11での連日治療終了後すぐに再増殖し始めた。

CPT-11投与により時にヒトで引き起こされる重篤な好中球減少や下痢はCPT-11の活性代謝物であるSN-38のグルクロン酸抱合能の低下と関連している<sup>13,14</sup>。マウスにCPT-11を投与すると、投与用量に関わらずその都度ほぼ80%の頻度で急性の下痢が認められたがいずれも軽微で、臨床で問題になる遅発性の下痢は全く見られなかった。低用量CPT-11・qd $\times$ 20の治療によるマウスの最大体重減少率は1週間の休薬期間を設ける[(qd $\times$ 5) $\times$ 2]2の場合と比べて必ずしも高くなく、qd $\times$ 20治療後の白血球数は無処理の対照群と変わらなかった。

CPT-11の*in vivo*での低用量・頻回投与あるいは連日投与が抗腫瘍効果を高めることがHoughton et alの研究でも我々の研究結果でも確認できたので、我々はすでに臨床でCPT-11を従来の3日間連日投与からHoughton et alに従った投与方法や低用量で長期に投与する方法に改め、明らかな有効性の向上をみている(未発表データ)。現在は12時間投与あるいは24時間の連続投与を試みている。Osone et al.<sup>15</sup>も末期神経芽腫患児にCPT-11の低用量・頻回投与を行い、その有

効性と患児のQOLの著明な改善を報告した。

CPT-11は*in vivo*非常に優れた抗腫瘍作用を有するが単剤では腫瘍の治癒は困難である。今後は低用量CPT-11のさらなる長期投与やそれと併用して相乗的な抗腫瘍効果が期待できる抗腫瘍剤、および、我々が報告<sup>16</sup>した鎮痛・抗炎症薬であるcelecoxibのようなmodulator薬剤の探索が急務である。

#### 文 献

- 1) Wall ME, et al: Plant Antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Am Chem Soc*, 88: 3888-3890, 1966
- 2) Hsian YH, et al: Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 260: 14873-14878, 1985
- 3) Kunimoto T, et al: Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res*, 47: 5944-5947, 1987
- 4) Toffoli G, et al: Pharmacogenetics of Irinotecan. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 3: 225-237, 2003
- 5) Hahn KK, et al: Pharmacogenetics and irinotecan therapy. *Am J Health Syst Pharm*, 63: 2211-2217, 2006
- 6) Geran RI, et al: Protocols for screening chemical agents and natural products against tumors and biological systems. *Cancer Chemother Rep*, 3: 51-61, 1972

- 7) Ovejera AA, et al: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci*, 8 : 50-56, 1978
- 8) Kurita A, et al: Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46 : 211-220, 2000
- 9) Houghton PJ, et al: Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 36 : 393-403, 1995
- 10) Kawato Y, et al: Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res*, 51 : 4187-4191, 1991
- 11) O'Leary J, Muggia FM: Camptothecins: a review of their development and schedules of administration. *Eur J Cancer*, 34 : 1500-1508, 1998
- 12) Rapisarda A, et al: Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts. *Cancer Res*, 64 : 6845-6848, 2004
- 13) Innocenti F, et al: Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, 22 : 1382-1388, 2004
- 14) Palomaki GE, et al: Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med*, 11 : 21-34, 2009
- 15) Osone S, et al: Low-dose protracted irinotecan as a palliative chemotherapy for advanced neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30 : 853-856, 2008
- 16) Kaneko M, et al: Prolonged low-dose administration of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib enhances the antitumor activity of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Cancer Sci*, 100 : 2193-2201, 2009

## Antitumor effects of irinotecan (CPT-11) against human neuroblastoma and rhabdomyosarcoma xenografts in nude mice

Setsuko KANEKO<sup>1)</sup>, Michio KANEKO

*1) Department of Pediatric Surgery, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba*

Among 10 antitumor drugs, i. e., cyclophosphamide, ifosfamide, cisplatin, carboplatin, melphalan, vincristine, etoposide, pirarubicin, actinomycin D and irinotecan (CPT-11), a semisynthetic derivative of camptothecin with topoisomerase I inhibitory activity, CPT-11 and cyclophosphamide were the most effective against three human neuroblastoma and three childhood rhabdomyosarcoma xenografts in nude mice when they were administered in conventional doses ( $LD_{50} \times 1/3$  per dose), three times at 4-day intervals. Treatment with low-dose ( $LD_{50} \times 1/30$  per dose, 5.9 mg/kg/dose) CPT-11 daily for 14 or 20 days was significantly more effective against 5 xenografted tumors out of the 6 compared to intermittent administration of conventional-dose CPT-11. Low-dose protracted CPT-11 administered without a long resting period had the most successful antitumor activity. CPT-11 induced an acute diarrhea score of 1 in approximately 80% of the mice at every injection, irrespective of the administered dose. However, no CPT-11-induced delayed diarrhea was observed. The daily low-dose schedule of CPT-11 therapy caused no substantial body weight loss nor reduced white blood cell count in mice.

---

Key Words: neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, xenograft, CPT-11, antitumor effect